UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

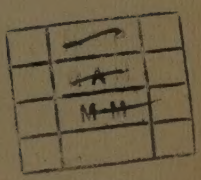
429

G. PICCI

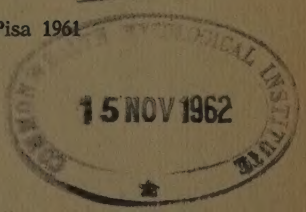
SOSTANZE DI ACCRESCIMENTO E MICROBI DEL TERRENO

(Rassegna sintetica)

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 9 Settembre 1961.



Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961



UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

429

G. PICCI

SOSTANZE DI ACCRESCIMENTO E MICROBI DEL TERRENO

(Rassegna sintetica)

Estratto da « *L'Agricoltura Italiana* » - N. 9 Settembre 1961.

Tipografia Editrice Comm. U. GIARDINI - Pisa 1961

SOSTANZE DI ACCRESCIMENTO E MICROBI DEL TERRENO

(Rassegna sintetica)

RIASSUNTO. — Vengono passati in rassegna sintetica i lavori concernenti la presenza ed il ruolo delle sostanze di accrescimento di natura microbica nel terreno. Si pone inoltre il problema delle interazioni pianta-microrganismi in rapporto all'effetto rizosfera, con particolare riguardo ai fitopatogeni.

Generalità

Nell'ambito della flora microbica del terreno — tipicamente eterogenea — si viene a stabilire una complessa serie di rapporti tra i vari gruppi di microrganismi presenti. In altre parole, questi si influenzano a vicenda in un determinato senso, direttamente o indirettamente. Data la complessità del fenomeno, sarà ben difficile poter classificare e tenere distinti tali rapporti. Comunque sembrerebbe che questi fossero essenzialmente riportabili a due tipi: rapporti *antagonistici e associativi.*

Intorno all'antagonismo microbico esiste oggi una letteratura veramente imponente che molto ha contribuito e contribuisce alla comprensione del complesso fenomeno. E' inutile soggiungere che il maggior numero di ricerche su questo argomento è del tutto recente ed è intimamente legato agli studi sugli antibiotici; poichè l'antibiosi altro non è che un aspetto dell'antagonismo microbico.

I rapporti associativi, invece, sono assai meno studiati dei precedenti e le nostre cognizioni in materia sono tuttora assai limitate. Questo si può affermare con particolare riguardo nei confronti di un aspetto dei rapporti associativi stessi, vale a dire per le sostanze di accrescimento nel terreno e per il ruolo che queste esplicano nei riguardi della flora microbica. In effetti tale fenomeno — del tutto analogo all'antagonismo — ha una importanza non certamente minore di questo da un punto di vista finalistico, in quanto si comprende facilmente quanta parte esplichino le sostanze rego-

latrici l'accrescimento microbico nel mantenimento dell'equilibrio dinamico di natura biologica nel terreno.

Presenza di sostanze di accrescimento nel terreno.

Viene attualmente ammesso, con quasi unanimità di consensi, che la maggior parte, se non addirittura tutte, le vitamine del complesso B, come pure altri fattori dell'accrescimento microbico, siano *presenti* nel terreno. Sebbene le prime ricerche sopra le sostanze di accrescimento nel suolo avessero una finalità botanica (si studiava infatti l'influenza di queste sulla crescita delle piante) già nel 1920 Mockeridge ([31]) segnalava che gli « auximoni » estratti da concime organico manifestavano un'azione di stimolo non solo verso le piante, ma anche sull'attività dei microrganismi del suolo. La provenienza di tali auxine veniva attribuita ai microbi terricoli, ma la natura delle sostanze in questione rimaneva sconosciuta. Altri lavori, ancora di carattere di segnalazione, si debbono a Sanborn ([40]), Pringsheim ([35]), Lwoff e Lederer ([30]). Secondo il primo di questi AA., estratti acquosi di terreno con residui vegetali in decomposizione stimolavano sensibilmente l'accrescimento di un cellulosolitico: *Cellulomonas folia.* Il secondo A. riportava l'azione di stimolo, ancora di un estratto di terreno, verso svariate specie di Flagellati e suggeriva la presenza del « bios » nel mezzo. Ad analoghi risultati e conclusioni erano infine giunti Lwoff e Lederer, ancora nei confronti di un Flagellato: *Polytomella agilis* ed escludevano che l'effetto positivo fosse imputabile a sostanze umide o minerali apportate nel mezzo.

I primi a dimostrare però la presenza di vitamine nel terreno furono Lilly e Leonian ([15]) servendosi di metodi di dosaggio a base microbiologica. I funghi adoperati dagli AA. furono: *Phytophthora erythroseptica, Phycomyces blakesleanus, Mucor ramannianus* e *Pythiomorfa gonapodioides*, rispettivamente rivelatori della molecola completa della tiamina, del gruppo tiazolico e pirimidinico (insieme e separatamente considerati). L'accrescimento dei funghi titolatori si registrava soltanto in presenza di estratto di terra. Fu inoltre evidenziata la biotina adoperando *Sordaria fimicola.*

Eseguendo determinazioni in più orizzonti di terreno, Lilly e Leonian pervennero alla conclusione che la concentrazione unitaria delle vitamine reperite variava in ragione inversa alla profondità del campionamento.

Poco tempo dopo Müller ([32]) ottiene analoghi risultati saggiando terreni forestali e di campo. La riboflavina fu evidenziata da Carpenter ([7]) in diversi terreni e la sua presenza fu posta in relazione all'ammontare di s. organica presente nel mezzo. Secondo l'A. la provenienza della B_2 era spiegata dal disfacimento dei residui vegetali o dalla biosintesi da parte dei funghi terricoli.

Ricerche più esaurienti le dobbiamo a Roulet ([37]) e Roulet e Schopfer ([38]). Il primo A. non solo evidenzia la biotina e tiamina nel terreno, ma fornisce dei dati quantitativi sulla concentrazione della vitamina a diverse profondità. Precisamente a 10 e 50 cm di profondità si hanno rispettivamente 19,3 mcg di tiamina e 0,62 e 0,2 mcg di biotina per grammo di terreno. Tali dati non rimanevano costanti nel tempo, registrandosi delle variazioni stagionali specialmente con riferimento allo strato superficiale del terreno. Successivamente Roulet e Schopfer dosano nel suolo, oltre la tiamina e biotina, anche riboflavina, inositolo, piridossina, ac. nicotinico e acido para amino benzoico. Secondo gli AA. citati la provenienza di dette vitamine è rappresentata ancora da residui vegetali e animali, da concimi organici e dalla biosintesi microbica. Anche la vitamina B_{12} viene reperita nel terreno ([36], [21], [28]) in concentrazioni di 2-15 mcg per gr. di suolo in terreni di giardino, serra e prato.

Oltre alle vitamine sopra rammentate è stato trovato nel terreno un fattore di accrescimento, denominato «fattore terrigeno» (TF), ad opera di Lochhead e Burton ([19]), Burton e Lochhead ([4]), Burton et al. ([6]).

Come si vede la presenza di sostanze di accrescimento nel terreno è indubbia; e la loro genesi si può riportare prevalentemente alla biosintesi microbica. Tuttavia i dati che abbiamo sommariamente esposto, anche se riportano delle cifre, non si può dire che ci illuminino sufficientemente sul complesso fenomeno in quanto colgono un attimo dello svolgersi di questo. Starkey, dal canto suo, affronta il problema da un punto di vista dinamico e studia lo andamento della formazione di sostanze di accrescimento in funzione del tempo. In un primo lavoro l'A. ([42], [43]) studia i cambiamenti nel tenore di riboflavina, ac. pantotenico e nicotinico durante la decomposizione di materiali organici. In misture di paglia ed erba il contenuto delle vitamine aumentava con la fase logaritmica dell'accrescimento microbico per diminuire successivamente con l'aumentare del disfacimento del ma-

teriale. Ciò fa intuire che le vitamine, una volta prodotte nel mezzo, vanno anche incontro a processi non soltanto degradativi, ma anche assimilativi da parte di organismi auxoeterotrofi.

Una ricerca analoga, ma nel terreno, fu condotta da SCHMIDT e STARKEY ([41]), qualche anno dopo. Gli AA. incorporarono dei residui di piante nel suolo e seguirono, nel tempo, l'ammontare di riboflavina e ac. pantotenico. Anche in questo caso il risultato fu del tutto analogo a quello ottenuto nella ricerca precedente.

Questi lavori ci dimostrano, anche se in modo incompleto, che anche i fattori di accrescimento presenti nel terreno non sfuggono all'intenso dinamismo che regola armonicamente il pullulare di vita in seno al terreno stesso. La concentrazione di vitamine o sostanze vitamino simili nel suolo in un dato momento altro non rappresenta che il prodotto delle azioni costruttive e quelle distruttive.

Biosintesi delle sostanze di accrescimento nel terreno.

Una volta stabilita, in maniera inequivocabile, la *presenza* nel terreno di sostanze di accrescimento, sorge il problema di considerare la loro *provenienza*. A rigor di logica dovremmo parlare di « provenienze » in quanto le sorgenti delle sostanze auxiniche sono rappresentate dai residui vegetali e animali, dai fertilizzanti organici, dall'apparato radicale della pianta e dai microrganismi. Abbiamo volutamente posto per ultimo la biosintesi microbica perchè sembra ormai accertato che questa rappresenti la fonte primaria di vitamine nel terreno. Questo fatto non deve meravigliare in quanto, diremmo, risponde ad una logica conseguenza di un particolare habitus fisiologico di determinati microrganismi. In altre parole vogliamo riferirci al fenomeno dell'auxoautotrofismo microbico — sia questo totale, parziale o condizionato — che nel terreno certamente si estrinseca. Se questo fatto lo mettiamo poi in rapporto allo sterminato numero di microrganismi che sono presenti nell'unità di peso del suolo, sarà agevole arrivare alla conclusione della importanza predominante, anche se non unica, della biosintesi microbica nel quadro dell'origine delle sostanze di accrescimento nel terreno.

Naturalmente, queste deduzioni è stato possibile formularle, su dati

concreti, solamente in tempi molto recenti in quanto era necessario dimostrare la biosintesi di determinate vitamine da parte di microrganismi isolati dal terreno il che comporta una metodica, come sappiamo, piuttosto complessa e di recente acquisizione.

A parte il lavoro di Schmidt e Starkey già citato, ricorderemo, ad es., una complessa serie di ricerche miranti a dimostrare la sintesi della B_{12} da parte di batteri e attinomiceti (Darken ([10])) e da alcune specie di *Rhizobium* ([5], [46]). In tempi molto recenti è stata dimostrata la sintesi della tiamina, biotina, riboflavina, vit. B_{12} e TF da parte di 316 colture microbiche isolate da un terreno di controllo e dalla rizosfera di piante di riso ed orzo (Lochhead ([24])). I risultati di questo lavoro ci sembrano assai interessanti e quindi crediamo opportuno riportarli seppure molto brevemente. La più alta percentuale di ceppi isolati risultò essere quella comprendente microrganismi sintetizzati riboflavina; seguiva la tiamina, la B_{12} e, un po' a distanza, la biotina ed il « fattore terrigeno ». Comparando il terreno controllo con quello della rizosfera si osserva complessivamente una maggiore percentuale nel numero di ceppi isolati da quest'ultima che sintetizzano vitamine. Passando ai fattori di accrescimento singolarmente considerati vediamo che non esistono differenze tra il terreno controllo e la rizosfera delle due piante per quanto riguarda la B_{12} e il TF, mentre nei confronti della rizosfera dell'orzo, si nota un sensibile aumento nelle percentuali dei ceppi isolati nei confronti della riboflavina, tiamina e biotina. Tenendo poi conto del forte incremento numerico dei microrganismi in prossimità delle radici, ben si comprenderà che il numero dei germi, in valore assoluto, biosintetizzanti vitamine sarà molto superiore nella rizosfera rispetto al terreno di controllo.

Successivamente Cook e Lochhead ([9]), in un'analoga ricerca, prendono in considerazione oltre la rizosfera anche la « rizoplana » di piante di grano ([*]). Le percentuali del numero dei ceppi microbici isolati in quest'ultima e sntetizzanti vitamine sono superiori anche a quelli isolati nella rizosfera. Tali risultati sono da mettersi in relazione con i più stretti rapporti radice-microbio che si riscontrano nell'ambito della rizoplana rispetto alla rizosfera.

([*]) Come proposto da Clark ([8]), per rizoplana si intende il microambiente costituito dalla *superficie* radicale, distinguibile dalla rizosfera che, al contrario, si concretizza nelle immediate immediate vicinanze della radice stessa.

Inoltre, recentemente ([39]) è stata dimostrata la capacità della produzione di sostanze di accrescimento da parte di *Nitrosomonas europaea*. Infatti aggiungendo autolisati di tale microrganismo a colture di lieviti auxoeterotrofi per uno o più fattori, è stato possibile ottenere un accrescimento dei germi test superiori a quello raggiunto quando venivano somministrate al mezzo determinate vitamine singole od in combinazione. Fu dimostrata la presenza, nell'autolisato sopra rammentato, anche della B_{12}, condizionata tuttavia alla presenza di Co nel terreno di coltura di *N. europaea*.

Utilizzazione delle sostanze di accrescimento nel terreno.

Abbiamo preso in considerazione una delle fonti, e molto probabilmente la più importante, delle sostanze di accrescimento nel terreno. Una volta che abbiamo visto che queste sono presenti nel suolo, possiamo chiederci quale destino tali sostanze subiscano. A questo proposito potremmo fare, a nostro parere, delle considerazioni del tutto analoghe a quelle che si formulano a proposito degli antibiotici nel terreno. Infatti una parte di ambedue le sostanze (antibiotici e vitamine) va incontro a processi di degradazione e/o immobilizzazione e tali processi hanno una base fisico-chimica. Un'altra parte, viceversa, esercita la sua azione sopra determinati microrganismi: gli antibiotici esplicano il loro potere antagonista sopra i germi sensibili, le sostanze (antibiotici e vitamine) va incontro a processi di degradazione più rigogliosa — delle specie auxoeterotrofe. Anche a questo proposito esiste una serie di ricerche miranti a dimostrare l'esistenza, nel terreno, di specie microbiche che richiedono per il loro sviluppo la presenza nel mezzo di determinate sostanze di accrescimento.

Un primo lavoro preliminare in tal senso si deve a West e Lochhead ([47]) i quali osservarono che molti batteri isolati dal terreno richiedono una o più vitamine, come ad es. tiamina, biotina, ac. nicotinico e inositolo, soli od in combinazione. Partendo da questi dati, successivamente Lochhead e Chase ([25]) tracciarono una classificazione dei batteri terricoli sulla base delle loro esigenze auxologiche. Tali AA. osservarono che in tutti i terreni esaminati esisteva un gruppo di microrganismi il cui accrescimento era condizionato dalla presenza nel mezzo di una combinazione di sette vitamine. Inoltre veniva evidenziato un altro gruppo di germi i quali dipende-

vano da uno o più fattori non identificati presenti in estratti acquosi di terreno. Questo fattore, o fattori, non potevano essere sostituiti nè da combinazioni di aminoacidi, nè da combinazioni di vitamine (inclusa la B_{12}), nè da estratto di lievito. Per alcuni microrganismi, tuttavia, l'estratto acquoso poteva essere sostituito da un idrolisato di batteri a semplici esigenze di accrescimento, mentre per altri germi l'estratto di terra era insostituibile. Questi fatti ovviamente deponevano per l'esistenza di più fattori, di natura ancora sconosciuta, presenti in estratti acquosi di terreno. Abbiamo già in precedenza accennato alla presenza nel suolo dal «fattore terrigeno». Ebbene anche questo risulta essere richiesto da *Arthrobacter terregens*. Solamente filtrati di autolisato di *Arthobacter pascens* potevano sostituite l'azione del TF.

Quanto esposto fin d'ora, sebbene ci ragguagli sull'esistenza di microrganismi terricoli che esigono sostanze di accrescimento, singole o combinate, conosciute o meno, non ci permette tuttavia di inquadrare il fenomeno al di fuori di un ambito circoscritto e frammentario. Erano cioè necessarie delle ricerche sistematiche e dettagliate sull'habitus auxoeterotrofico della flora microbica terricola. Una serie di ricerche sull'argomento la troviamo ad opera di Lochhead e della sua Scuola. In un primo lavoro ([22]), si studiano i mezzi trofici necessari all'isolamento e studio delle specie microbiche. Infatti secondo Lochhead e Burton i terreni nutritivi migliori per la valutazione degli aspetti quantitativi delle colture isolabili sono rappresentati da quelli non selettivi, vale a dire, ad es., dall'agar-estratto di terra senza aggiunta di nessun materiale energetico. Sebbene con tali mezzi alimentari il periodo di incubazione sia più lungo del normale (circa 14 giorni), il numero dei germi contati è normalmente più elevato; non soltanto, ma anche gli effetti antagonistici e associativi sono minimamente manfesti ([44]). Seguendo tale metodica Lochhead et al. ([27], [28]) ci danno il primo reperto quantitativo sulla percentuale di microrganismi del suolo richiedenti B_{12}. Infatti su di un totale di 534 ceppi isolati da un terreno di campo, l'incidenza di microrganismi B_{12}-dipendenti andava dal 41 al 7,6%. Lo sviluppo di questi non poteva aver luogo se non in presenza di cianocobalamina (2mμg./cc), estratto di terreno, oppure di autolisato di batteri a semplice accrescimento. In un altro lavoro più particolareggiato, Lochhead e Burton ([20]) si occuparono del comportamento morfo-fisiologico di alcuni microrganismi

B_{12}-dipendenti. In 10 gruppi differenziati tra i batteri isolati fu osservato che la B_{12} e la tiamina erano indispensabili per tutti; mentre la biotina lo era per 8. Morfologicamente si avevano tre gruppi di cocchi, un gruppo rappresentato da una forma filamentosa, pleomorfica, ricurva e non ramificata. I rimanenti 6 gruppi furono classificati come *Arthobacter* sp. Alcuni tra i ceppi isolati in questo lavoro furono oggetto di altre due ricerche, rispettivamente ad opera di Ford e Hutner ([11]) e Golberg et al. ([12]). I primi AA. osservarono che su 19 ceppi considerati, uno soltanto si dimostrò sensibile al fattore A o B o pseudovitamina B_{12}. Da parte loro, Golberg e Coll., studiando solamente un ceppo, misero in luce la sua dipendenza dalla cianocobalamina e vitamina B_{12} III. Ancora a proposito della vitamina B_{12}, Lochhead e Burton ([21]) esaminarono ben 2877 colture isolate da terreno controllo e dalla rizosfera di grano, orzo e soia. I dati percentuale del numero dei germi B_{12}-dipendenti nel terreno controllo erano superiori a quelli della rizosfera. Considerando invece i dati in valore assoluto, si aveva un risultato opposto dato il numero maggiore di microrganismi nelle zone adacenti alla radice.

Ricerche effettuate con altre vitamine del complesso B, oltre la B_{12}, sortirono analoghi risultati sia nella rizosfera che nella rizoplana di piante di grano (Cook e Lochhead, ([9])).

Le stesse vitamine del gruppo B risultano indispensabili o stimolanti per un vasto gruppo di microrganismi terricoli (Lochhead e Burton ([21], [22])). L'A. esamina 499 ceppi microbici il 27% dei qual risulta essere gruppo B-dipendente. Le vitamine richieste per ordine di frequenza furono: tiamina, biotina, cianocobalamina, ac. pantotenico, folico, nicotinico, riboflavina, piridossina, ac. para-amino-benzoico, colina e inositolo.

Inoltre il «fattore terrigeno» risulta anch'esso una sostanza di accrescimento essenziale per determinati microrganismi tutti appartenenti al genere *Arthrobacter*. Secondo Burton ([2]) tali microrganismi, non soltanto hanno un identico comportamento nei riguardi del TF, ma anche per determinati composti a base di Fe ([14], [33], [34]), nonchè biotina e tiamina. L'ac. para-aminobenzoico veniva richiesto da un solo ceppo, mentre per *A. terregens* era indispensabile anche l'ac. pantotenico, come previamente dimostrato ([4]). Paragonando numericamente i batteri B_{12} dipendenti con quelli TF-dipendenti, è stato visto che questi ultimi sono grosso modo 1/10 dei primi, raggiungendo i 100.000-500.000 per grammo di terreno ([21]).

Conclusioni

Da quanto esposto in questa rassegna sintetica si può vedere con sufficiente chiarezza l'inserirsi del « metabolismo » delle sostanze di accrescimento nel terreno nell'ambito del complesso dinamismo dei fenomeni a sede pedologica. Ma, come giustamente fa osservare Lochhead ([18]), se consideriamo il fatto che nella rizosfera si ha un aumento in valore assoluto dei germi auxoeterotrofi ed ancor più di quelli auxoautotrofi, possiamo formulare altre ed interessanti considerazioni.

Infatti, all'effetto-rizosfera inteso nel senso comune si aggiunge anche l'altro fenomeno qui considerato, cioè a dire la presenza di sostanze di accrescimento in concentrazioni maggiori nel microhabitat che circonda l'apparato radicale. Questo fatto ovviamente avrà un peso ben rilevante nelle interreazioni pianta-microrganismi, con particolare riferimento ai fitopatogeni della radice.

Per quanto concerne i riflessi dell'effetto-rizosfera, in senso tradizionale, sopra i microrganismi fitopatogeni, già da tempo furono effettuate ricerche da Lochhead e Coll. ([16], [29], [45], [47]), da Buton ([3]), da Agnihothrudu ([1]) Harper ([13]) e Timonin ([45]). In senso generale potremmo dire che l'effetto-rizosfera si dimosta più marcato in piante suscettibili rispetto a quelle resistenti.

Per quanto concerne invece le relazioni tra sostanze di accrescimento, fitopatogeni e piante suscettibili e resistenti, citeremo una ricerca recentissima di Lochhead e Cook ([26]) a proposito di varietà di lino rispettivamente sensibili e resistenti a *Fus. oxysporum* f. *lini*. Anche in questo caso si nota un effetto-rizosfera, inteso però in senso « auxinico », maggiore nelle piante suscettibili, in quanto si osserva una percentuale maggiore di germi vitamino-sintetizzanti nella rizosfera, rizoplana e spermosfera delle piante suscettibili stesse.

Non c'è bisogno di sottolineare l'interesse di questo tema di ricerche in quanto pone in relazione un aspetto trofico di un patogeno e la capacità di questo ad indurre la malattia.

G. Picci

Istituto di Microbiologia Agraria
dell'Università di Pisa

BIBLIOGRAFIA

1) - AGNIHOTHRUDU, V.: *The density of the rhizosphere microflora of pigeon-pea* (Cajanus cajan (L.) Millop.) *in relation to the wilt caused by* Fus. udum *Butler.* Naturwissenschaften, *18*, 797, 1957.

2) - BURTON, M. O.: *Characteristic of bacteria requiring the terregens factor.* Can. J. Microbiol., *3*, 107, 1957.

3) - BUXTON, E. W.: *Differential rhizosphere effects of threee pea cultivars on physiological races of* Fus. oxysporum *f.* pisi. Brit. Micol. Soc. Trans., *49*, 305, 1957.

4) - BURTON, M. O. and LOCHHEAD, A. G.: *Nutritional requirements of* Arthrobacter terregens. Can. J. Botany, *31*, 145, 1953.

5) - BURTON M. O. and LOCHHEAD, A. G.: *Production of vitamin B_{12} by* Rhizobium *species.* Can. J. Botany, *30*, 521, 1952.

6) - BURTON, M. O. e Coll.: *Studies on the isolation and nature of the terregens factor.* Can. J. Biochem. Physiol., *32*, 400, 1954.

7) - CARPENTER, C. C.: *Riboflavin-vitamin B_2 in soil.* Science, *98*, 109, 1943.

8) - CLARK, F. E.: *Soil microorganisms and plant roots.* Advances in Agron., *1*, 241, 1949.

9) - COOK, F. D. and LOCHHEAD, A. G.: *Growth factor relationship of soil microorganisms as affected by proximity to the plant root.* Can. J. Microbiol. *5*, 323, 1959.

10) - DARKEN, M. A.: *Production of vitamin B_{12} and its occurrence in plant tissue.* Botan. Rev. *19*, 99, 1957.

11) - FORD, J. E. and HUTNER, S. H.: *On the nature of the vit. B_{12} requirements in soil bacteria isolated by Lochhead and his co-workers.* Can. J. Microbiol., *3*, 319, 1957.

12) - GOLBERG, M. K. e Coll.: *Nutrition of a cobalamin-requiring soil bacterium.* Can. J. Microbiol., *3*, 329, 1957.

13) - HARPER, J. L.: *Studies in the resistance of certain verieties of banana to Panama disease.* Plant and Soil *2*, 383, 1950.

14) - HESSELTINE, C. W. e Coll.: *Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi.* J. Am. Chem. Soc., *74*, 1362, 1952.

15) - LILLY, V. G. and LEONIAN, L. H.: *Vitamin B_1 in soil.* Science, *98*, 292, 1939.

16) - LOCHHEAD, A. G.: *Qualitative studies of soil microorganisms. III. Influence of plant growth on the character of the bacterial flora.* Can. J. Research, *C. 18*, 42, 1940.

17) - LOCHHEAD, A. G.: *Qualitative studies of soil microorganisms. XV. Capability of the predominant bacteria flora for synthesis of various growth factors.* Soil Sci., *84*, 395, 1957.

18) - LOCHHEAD, A. G.: *Soil bacteria and growth-promoting substances.* Bacteriol. Revs., *22*, 145, 1958.

19) - Lochhead, A. G. and Burton, O. M.: *An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis.* Can. J. Botany, *31*, 7, 1953.

20) - Lochhead, A. G. and Burton, M. O.: *Qualitative studies of soil microorganisms. III. Influence of plant growth on the character of the bacteria flora.* Can. J. Research, *C*, *18*, 42, (1940).

21) - Lochhead, A. G. and Burton, M. O.: *Incidence in soil of bacteria requiring vitamin B_{12} and the terregens factor.* Soil Sci., *82*, 237, 1956.

22) - Lochhead, A. G. and Burton, M. O.: *Importance of soil extract in the enumeration and study of soil bacteria.* Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 6th Congr., Paris, *C*, 157, 1956.

23) - Lochhead, A. G. and Burton M. O.: *Soil as habitat of vitamin-requiring bacteria.* Nature, *178*, 144, 1956.

24) - Lochhead, A. G. and Burton, M. O.: *Qualitative studies of soil microorganisms. XIV. Specific vitamin requirements of the predominat bacterial flora.* Can. J. Microbiol., *3*, 35, 1957.

25) - Lochhead, A. G. and Chase, F. E.: *Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora.* Soil Sci., *55*, 185, 1943.

26) - Lochhead, A. G. and Cook, F. D.: *Microbial growth factors in relation to resistance of flax varieties to Fusarium wilt.* Can. J. Botany, *39*, 7, 1961.

27) - Lochhead, A. G. and Texton, R. H.: *Vitamin B_{12} as a growth factor for soil bacteria.* Nature, *167*, 1034, 1951.

28) - Lohhead, A. G. and Texton, R. H.: *Qualitative studies of soil microorganisms. X. Bacteria requiring vitamin B_{12} as growth factor.* J. Bacteriol *63*, 219, 1952.

29) - Lochhead, A. G., Timonin, M. I. and West, P. M.: *The microflora of the rhizosphere in relation to resistance of plants to soil-borne pathogens.* Sci Agr., *20*, 414, 1940.

30) - Lwoff, A. et Lederer, E.: *Remarques sur l'extrait de terre envisagé comme facteur de croissance pour les flagelles.* Compt. Rend. Soc. Biol., *119*, 971, 1935.

31) - Mockeridge, F. A.: *The occurence and nature of the plant growth-promoting substances in various organic manurial composts.* Biochem J. *14*, 432, 1920.

32) - Muller, W. F.: *Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes* Mucor ramannianus. Ber. schweiz. botan. Ges., *51*, 165, 1941.

33) - Neilands. J. B.: *A cristalline organo-iron pigment from a smut fungus* (Ustilago sphaerogena). J. Am. Chem. Soc. *74*, 4846, 1952.

34) - Neilands, J. B.: *Some aspect of microbial iron metabolism.* Bacteriol. Revs., *21*, 101, 1957.

35) - Pringsheim, E. G.: *Wuchsstoffe im Erboden?* Naturw., *12*, 197, 1935.

36) - Robbins, W. J. e Coll.: *Studies on Euglena and vitamin B_{12}.* Bull. Torrey Botan. Club., *77*, 423, 1950.

37) - Roulet, M. A.: *Reserches sur les vitamines du sol.* Experientia, *4*, 149, 1948.

38) - Roulet, M. A. et Schopfer, W. H.: *Les vitamines du sol et leur signification.* Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 4th Congr., Amsterdam, *1*, 202, 1950.

39) - RUBAN, E. L.: *The synthesis of vitamins in cultures of* Nitrosomonas europaea. Dokl. Akad. Nauk., 120, 193, 1958.

40) - SANBORN, J. R.: *Essential food substances in soil.* J. Bacteriol., *13,* 113, 1927.

41) - SCHIMIDT, E. L. and STARKEY, R. L.: *Soil microorganisms and plant growth substances. II. Transformation of certain B vitamins in soil.* Soil Sci., *71,* 221, 1951.

42) - STARKEY, R. L.: *Transformation of riboflavin and pantothenic acid during decomposition of plant materials.* Soil Sci. Soc. Am.; Proc., *7,* 237, 1942.

43) - STARKEY, R. L.: *Changes in the contact of certain B-vitamin in organic materials decomposing under aerobic and anaerobic condition.* Soil Sci., *57,* 247, 1944.

44) - STEVENSON, I. L. and ROUAT, J. W.: *Qualitative studies of soil microorganisms. XI. Further observations on the nutritional cassification of bacteria.* Can. J. Botany, *31,* 438, 1953.

45) - TIMONIN, M. I.: *The interaction of higher plants and soil microorganisms. III. Effect of plant growth on activity of fungi and actimomycetes.* Soil Sci., *52,* 395, 1941.

46) - VYAS, S. R. and PRASAD, N.: *Production of vitamin B_{12} by Rhizobia in Gujarat soil.* J. Sci. Ind. Research (India), *15 C,* 52, 1956.

47) - WEST, P. M. and LOCHHEAD, A. G.: *Qualitative studies of soil microorganisms. IV. The rhizosphere in relation to the nutritive requirements of soi bacteria.* Can. J. Research., *C, 18,* 129, 1940.